

- 3) Chimioterapia eliminează metastazele glandulare, reducând rata recidivelor locale și la distanță, crescând procentul și perioada de supraviețuire.
- 4) Abordarea multidisciplinară a limfoamelor extraganglionare cu tratament în echipă, permite obținerea unor rezultate favorabile.

### **Bibliografie**

1. Vasilescu C. Limfomul gastric primitiv – București, 2002, p.11-16.
2. Pfau PR și Chak A. Endoscopic ultrasonography. *Endoscopy*, 2002, 34:21-28.
3. Aschie M. Limfoame maligne non- hodgkeniene gastrointestinale. Entități anatomic-clinice și morfologice – Constanța: Muntenia și Leda, 2001.
4. Isaacson PG. Mucosa – Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Semin Hematology*, 1999, 36:139-147.
5. Boot H., de Jong D., Aleman B și Taal BG (2000). Gastrointestinal lymphomas – the Dutch experience. In: *Gastrointestinal lymphomas. Future perspectives*. Berlin, Heidelberg: Springer, 93-98.
6. Kodera Y, Yamamura Y, Nakamura S, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Moritoto T, Kato T și Kito T (1998) The role of radical gastrectomy with systematic lymphadenectomy for the diagnosis and treatment of primary gastric lymphoma. *Ann. Surg.*, 227:45-50.
7. Gisbertz GA, Schonten HC, Bot FJ și Arends JW (1998). Cell turnover parameters in small and large cell varieties of primary intestinal non-Hodgkins lymphoma. *Cancer* 82: 158-165.
8. Zucca E și Conconi A (2001). Extraganglionar lymphomas – 85 – 96 In „Annual of lymphoid malignancies „, sub redacția Cavalli F, Armitage JO și Longo DL, Martin Dunitz Ltd, Londra.
9. Fischbach W (2000). Gastrointestinal lymphomas: The Wurzburg study experience. In: *Gastrointestinal lymphomas. Future and perspectives*. Berlin, Zeidelberg: Springer 134-140.

## **POLIPI EREDITARI ADENOMATOSI COLORECTALI LA PACIENTII REP. MOLDOVA- ASPECTE GENETICE**

**Lucian Palii<sup>1</sup>, Nicolae Barbacar<sup>2</sup>, Vladimir Hotineanu<sup>3</sup>, Tudor Timis<sup>3</sup>,  
Valentin Bendelic<sup>3</sup>, Anatol Vrabii<sup>3</sup>**

Laboratorul Chirurgie reconstructiva a tractului digestiv USMF „Nicolae Testemițanu”<sup>1</sup>,  
Institutul de Genetică al AȘM<sup>2</sup>, Catedra Chirurgie nr. 2 USMF „Nicolae Testemițanu”<sup>3</sup>

### **Summary**

#### ***General Aspects of the Hereditary colorectal polyps in Patients of the Republic of Moldova***

In the light of the progress achieved in the area of improving the methods of recombinant DNA technology, today it has become possible to diagnose a genetic disease, including the Hereditary colorectal polyps as a form of epithelial colorectal neoplasia (ECRN) at the level of genes. To identify the clinical differences between patients with sporadic adenoma from the ones with hereditary neoplasm, genetical-molecular investigations were carried out on a group of patients diagnosed with ECRN. Identification of genetic associations between polymorphous spectra of DNA and the genetic expression was done using the RT-PCR technique.

### **Rezumat**

Datorită progreselor înregistrate în perfecționarea metodelor tehnologiei ADN recombinat, astăzi este posibil diagnosticul unei boli genetice, inclusiv ale polipilor colorectali ereditari, ca formă de neoplazie epitelială colo-rectală (NECR), la nivelul genei. Un lot de

pacienți cu NECR a fost supus unor investigații genetico-moleculare, în scopul diferențierii clinice dintre subiecții cu adenomi sporadici de cei cu origine ereditară. Identificarea asocierilor genetice dintre spectrele polimorfe de ADN și expresia genică s-a fost efectuat prin intermediul tehnicii RT-PCR.

### Scopul lucrării

Perfecționarea strategiei de diagnostic al polipilor solitari și multipli de origine ereditară prin examinarea aspectului genetic al pacienților cu neoplazie colo-rectală (membrilor suspecti din familiile acestora) cu utilizarea tehnicii RT-PCR.

### Material și metode

Cercetarea științifică actuală reprezintă un studiu experimental genetic, bazat pe analiza materialului clinic de tratament chirurgical, în **perioada 2000-2009, a 84 de pacienți** cu Neoplazie Eitelială Colo-Rectală (NECR), vârsta pacienților varia de la 8 la 78 de ani, raportul dintre bărbați și femei fiind de aproximativ 1:1(40 femei și 44 bărbați). Cifra nu prea impunătoare de pacienți cu NECR se explică prin faptul că, de regulă, aceștia primesc tratamentul necesar încă în faza prespitalicească. Lotul luat în studiu aparține categoriei “pacienților complicați” cu patologie complexă, avansată, care adesea este asociată cu o malignizare- fapt determinant în necesitatea efectuării unui diagnostic și tratament calificat în condiții de staționar.

Privitor la distribuția polipilor pe traseul colonic, s-a remarcat o afectare mai frecventă a colonului stâng. Rezultatele obținute se prezintă în *tab. 1*.

*Tabelul 1*

#### Distribuția polipilor pe traseul colonic(%)

Localizarea	%
Canalul anal	21,58
Rect	23,74
Rect și colonul transvers	1,43
Colonul stâng	16,55
Colonul transvers	5,75
Colonul acendent, transvers și sigmoidă	4,31
Colon ascendent	5,03
Rectosigmoidă	18,70
Pancolonul	2,87
Total	100

Examenul histologic a confirmat la toți pacienții originea adenomatoasă a polipilor. La 22 pacienți  $19.4 \pm 2,5\%$  ( $p < 0,001$ ), a fost constatată o malignizare a polipilor, sub forma de adencarcinom invaziv sau carcinom-in-situ. S-a constatat o dependență direct proporțională între dimensiunile adenomului, caracteristicile lui histologice și gradul de malignizare a acestuia, fapt demonstrat în *fig. 1*.

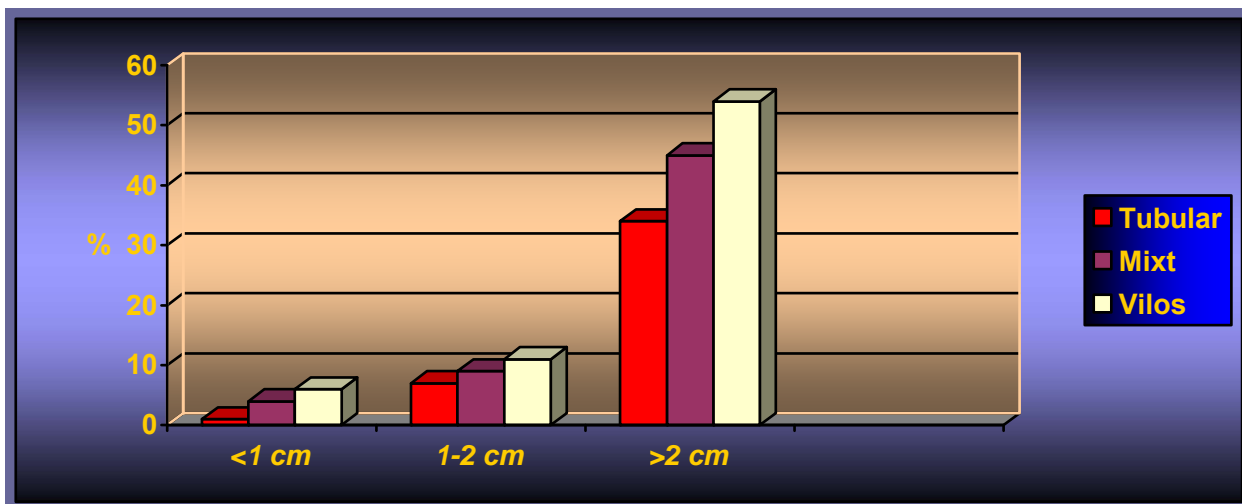


Fig.1. Predominarea fenomenului de malignizare la polipi de diversă structură morfopatologică

**Examenul genetic** al pacienților cu NECR a inclus cercetarea genetică și a presupus parcurgerea următoarelor etape:

- înregistrarea diagnosticului medical și al informațiilor despre părinți;
- întocmirea arborelui genealogic(pedigriul);
- analiza genealogică pentru stabilirea modului de transmitere;
- aprecierea riscului pentru persoanele aflate în relații cu subiectul studiat;
- analiza moleculară a ADN-ului și ARN-ului prin tehnica PCR și RT-PCR;
- analiza electroforetică a fragmentelor amplificate de ADN;
- determinarea spectrului polimorf (genetic) al genelor, care condiționează apariția NECR(forme ereditare);
- documentarea rezultatelor și analiza statistică a acestora.

Pentru stabilirea riscului s-a ținut cont de incidența bolii respective în populația generală, de etnie, de relațiile genetice cu un individ afectat, de penetranța și de influența mediului.

Datorită progreselor înregistrate în perfecționarea metodelor tehnologiei ADN recombinat, astăzi este posibil diagnosticul unei boli genetice, inclusiv al NECR la nivelul genei. Investigațiile genetice al lotului prospectiv de pacienți (și rudele suspectate) cu NECR au fost efectuate în Laboratorul – Organizare moleculară a genomului și expresia genelor, din cadrul Institutului de Genetica a AȘ RM, care au inclus următoarele etape:

-prelevarea și conservarea materialului biologic (sânge, polipi). Sângele fiind conservat în Sol. EDTA și păstrat în congelator la temperatura de minus-20-30°C. Polipii extirpați în mod nativ au fost congelați la aceeași temperatură;

- extracția moleculelor de ADN genomic;
- fragmentarea moleculelor de ADN cu endonucleaze de restricție;
- separarea fragmentelor de ADN prin electroforeza în gel;
- clonarea „in vitro” a genelor caracteristice NECR- **p53, Genelor hMLH1 (human Mut L homologue 1) și hMSH2 (human Mut S homologue** prin tehnica reacției RT-PCR (Poliymerase Chain Reaction).

Clonarea „in vitro” genelor sus-menționate prin reacția de înlantuire a polimerazei (PCR), constă în repetarea nelimitată a unui ciclu de trei reacții, și clonarea in vitro a genei sau fragmentului de ADN genomic studiat.

Clonarea „in vitro” genelor sus-menționate prin reacția de înlantuire a polimerazei (PCR), constă în repetarea nelimitată a unui ciclu de trei reacții, și clonarea in vitro a genei sau fragmentului de ADN genomic studiat.

### Rezultate obținute

**1.Studiul molecular al expresiei genei p53 la lotul prospectiv de NECR.** Au fost selectați și utilizați următorii primeri din structura primară a genei p53:

1. p53. 4F.1      5'-CTC TTT TCA CCC ATC TAC AGT CC-3'

2. p53. 4F 2 5'-TCT GGG AAG GGA CAG AAG AT-3'

Deasemenea s-au folosit pe larg markerii moleculari cu dimensiuni diferite: 10 kB; 8 kB; 6 kB; 4 kB; 3 kB; 2,5 kB; 2 kB; 1,5 kB; 1,0 kB; 0,8 kB; 0,6 kB; 0,4 kB; 0,2 kB propuși de compania Eurogentec "Smart" (SUA).

Rezultatul reacției RT-PCR la prezența genei p53 fiind demonstrat în următoarea imagine de mai jos.

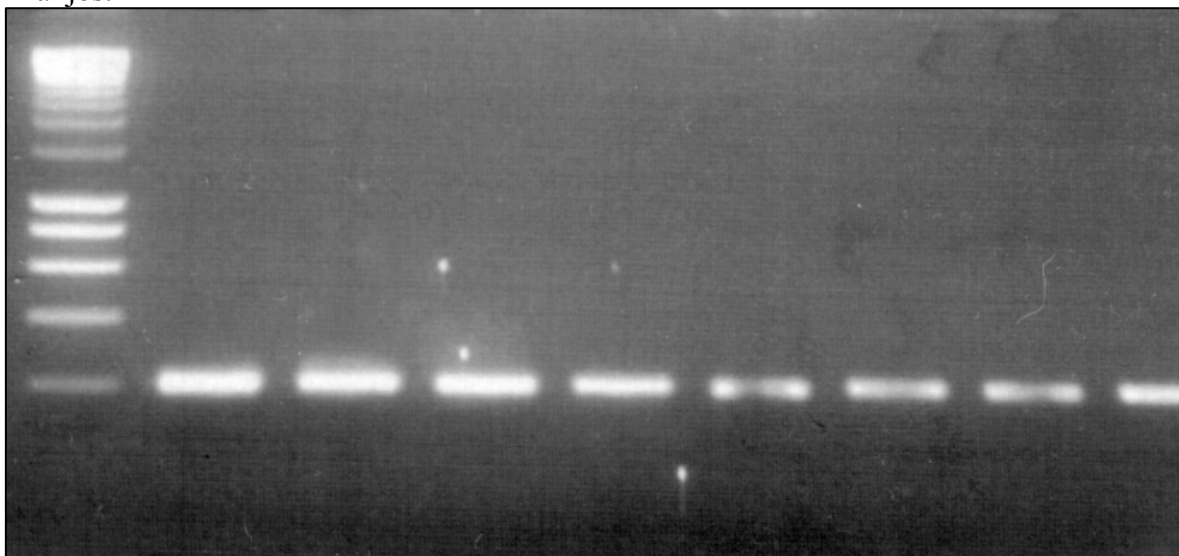


Fig. 2. Analiza calitativă a expresiei genei p53 la pacienții cu NECR

Din numărul total de bolnavi investigați la gena p53, frecvența înregistrată a rezultatelor pozitive este de  $97,6 \pm 2,4\%$  cazuri ( $p < 0.001$ ) ( Tab.A) cu cota mai pronunțată de gradul II(++) –  $63,4\%$ . Structura expresiei pozitive este prezentată în fig.3.

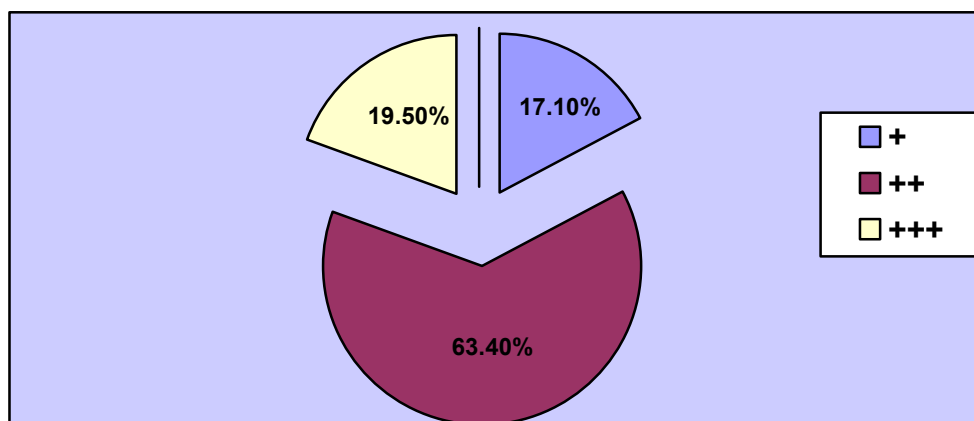


Fig.3. Structura bolnavilor cu testul pozitiv la gena p53

Tabelul 2

**Frecvența expresivității genei p53 la pacienții cu NECR**

\*- $p > 0,05$ ; \*\* - $p < 0,05$ ; \*\*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*\*- $p < 0,001$

Negativ(-)		Grad 1 +		Gradul 2 ++		Gradul 3 +++		Total rez. pozitive	
Abs.	P 1 $\pm$ m 1	Abs.	P 2 $\pm$ m 2	Abs.	P 3 $\pm$ m 3	Abs	P 4 $\pm$ m 4	Abs	P 5 $\pm$ m 5
2	2,4 $\pm$ 2,4 *	14	16,7 $\pm$ 5,7 **	52	61,7 $\pm$ 7,5 ***	16	19,0 $\pm$ 6,1 **	82	97,6 $\pm$ 2,4 ****

Studierea expresiei genei P53(fig.3), ne-a permis constatarea declanșării procesului tumorigeneză în faza tardivă. Astfel, această genă a fost considerată ca o oncogenă tardivă, cu scop de control, cu grad variat de expresie.

**2. Instabilitatea minisatelitică a genelor MSH1 și MLH2 și gradul de expresie.** Bolnavii supecți la sindromul Lynch au fost investigați la instabilitatea minisatelitelor prezente în genele mismatch- MSH1 și MLH2. Analiza RT-PCR cu utilizarea următorilor praimerii caracteristici cancerului colo-rectal ereditar nepolipos:

1. BAT 25 DIR. 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'
2. BAT 25 REV. 5'- TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'

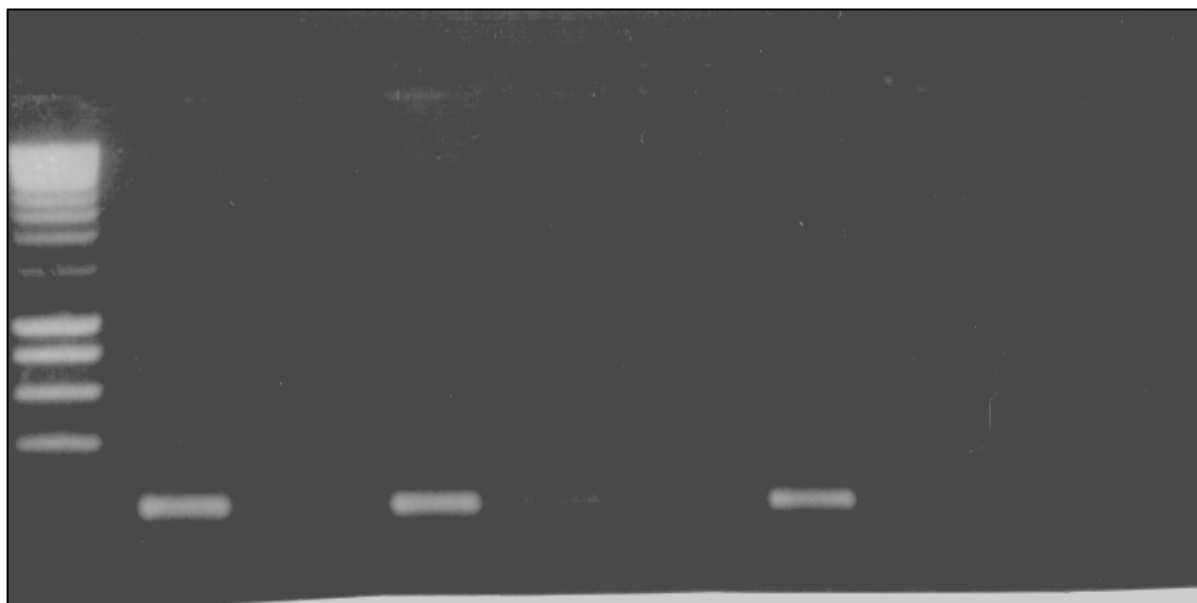


Fig. 4. Analiza electroforetică a fragmentelor izolate a genelor MLH1 și MSH2 prin tehnica RT-PCR

În calitate de matriță în reacția de revers-transcripție s-au utilizat eșantioane de ARN total izolat din celulele tumorogene a pacienților examinați. Pentru amplificarea fragmentelor de ADN obișnuit s-au utilizat primerii menționați mai sus, selectați din structura genelor **MLH1** și **MSH2**.

Analiza RT-PCR cu utilizarea praimerului BAT-25, a demonstrat o acumulare diferențiată a ARN-ului messenger, pentru genele **MLH1** și **MSH2**. Rezultatele obținute în cadrul experienței noastre denotă că, genele menționate se manifestă printr-o activitate transcripțională specifică.

Astfel, în urma reacției RT-PCR pe baza ARN-lui izolat din materialul biologic, s-au constatat 54,8 ±7,7% cazuri (p<0.01) cu expresie negativă, rezultat pozitiv la S.Lynch de gradul I(+) a fost determinat în 26,2 ±6,8% cazuri (p<0.005) și gradul II(++) în 19,0 ±6,1% (p<0.005) (tab.3).

Tabelul 3

**Frecvența expresiei genelor MSH1 și MLH2 la pacienții cu NECR**

Negativ(-)		Grad 1 +		Gradul 2 ++		Total rez. pozitive	
Abs.	P 1 ±m 1	Abs.	P 2 ±m 2	Abs.	P 3 ±m 3	Abs.	P 5 ±m 5
56	54,8±7,7 ***	22	26,2±6,8 **	16	19,0±6,1 **	38	45,2±7,7 ***

\*\* -p<0,05; \*\*\*-p<0,01;

Studiul comparativ al frecvenței genelor **p53** și **MSH1** și **MLH2** din lotul studiat îl prezentăm în (tab.4)

**Raportul frecvențelor în funcție de expresia genică  
(gena p53 și MSH1 și MLH2)**

-		t	p	+		t	p	++		t	p
p53	MSH1 MLH2			p53	MSH1 MLH2			p53	MSH1 MLH2		
2,4±2,4	54,8±7,7	6,5	***	16,7±5,7	26,2±6,8	1,1	*	61,9±7,5	19,0±6,1	4,7	***

\*-p>0,05; \*\* -p<0,05; \*\*\*-p<0,01;

Analiza comparativă a rezultatelor primite la bolnavii investigați referitor la **genele p53(oncogena) și MSH1 și MLH2 (mismatch repair genes-Sindromul Lynch)**, ne-a dat posibilitatea să stabilim că, frecvența cazurilor cu expresie negativă în lotul **MSH1 și MLH2** este în 23 ori mai înaltă, decât în lotul pacienților purtători de gena **p53-** (54,8±7,7% și 2,4±2,4% respective, p<0.01). Rezultatul pozitiv cu expresie de gradul II este de 3 ori mai înalt în lotul pacienților cu p53, față de lotul **MSH1 și MLH2**, fapt demonstrat în *tab.E*.

Aplicarea reacției RT-PCR (cantitativă) cu utilizarea praimerilor specifici, nominalizați anterior, a permis diferențierea genelor implicate în procesul de tumorigeneză. Astfel, în studierea genelor **MSH1 și MLH2** la o serie din persoanele, luate în cercetare, expresia genei respective, a avut un aspect foarte bine pronunțat. La alte persoane manifestare moderată, slabă sau lipsă de expresie. La unele din persoanele purtătoare de APC mutantă, s-a constatat o asociere cu instabilitatea secvențelor minisatelitice a genelor mismatch detectate cu ajutorul primerului BAT25.

### Concluzii

Asa dar, din punct de vedere genetic, conform rezultatelor obținute cu ajutorul tehnicii RT-PCR, s-a relevat o expresie diferențiată, în raport cu datele obținute la examenul patomorfologic (acumularea celulelor canceroase în materialul primar). În urma studiului efectuat, am constatat prezența simultană a celulelor modificate, ce se află la diferite stadii de cancerogeneză; prezența simultană a celulelor în stadiul precoce și tardiv- fenomen, datorat acțiunii variate a genelor implicate în mecanismul de declanșare a tumorigenezei.

Am constatat că, expresia comparativă a genelor specifice pentru sindromul ereditar Lynch MLH1, MSH2, de regula este diferită una față de alta. Desi, uneori am observat cazuri de omogenitate, adică o expresie în ansamblu a genelor menționate.

Având posibilitatea de a acumula și a conserva țesuturile vii în condiții speciale, am observat atât prezența, cât și gradul de expresia diferențiată a acestor gene în cadrul sindroamelor studiate. Manifestarea variabilă a genelor implicate în secvența adenom-cancer a constituit-momentul-cheie informațional în diagnosticul și tratamentul pacienților cu NECR la diferite etape de tumorigeneză. Tehnica utilizată în studiul nostru experimental contribuie la creșterea eficienței consultului medico-genetic și la eradicarea cancerului colorectal deja la etapele incipiente de dezvoltare și ca consecință la îmbunătățirea calității vieții pacienților afectați de NECR, în particular de cancer ereditar nepolipos colorectal.

### Bibliografie

- 1.Magliate DT, Keller KJ, Miller RE, et al. Colon and rectal carcinoma: spatial distribution and detection. Radiology 1993;147:669).
- 2.Lynch HT, Smyrk T: Hereditary nonpolyposis colon cancers (Lynch syndrome): an up-date review. Cancer 78:114, 1996
- 3.Herrera L, Kakati S, Gibas L, et al: Gardner syndrome in a man with a interstitial deletion of 5g. Am J Med Genet 25:473,1986
- 4.Cromwell DM, Moore RD, Bresinger JD, et al: Cost analysis of the alternative approaches to colorectal screening in familial adenomatous polyposis. Gastroenterology 114:893, 1998;

5. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE., et al: Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 93:1009, 1987
6. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al: Incidents of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338:1448, 1998;
7. Young J, Leggett B, Gustafson C, Ward M, Searle J, Thomas L, Buttenshaw R, Chenevix-Trench G: Genomic instability occurs in colorectal carcinomas but not in adenomas. *Hum Mutat* 1993, 2:351-354
8. Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin J-P, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, Sistonen P, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994, 54:1645-1648
9. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M: Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996, 111:307-317
10. Järvinen H, Mecklin J-P, Sistonen P: Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995, 108:1405-1411
11. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, Ackroyd F, Shike M, Kurtz RC, Hornsby-Lewis L, Gerdes H, Stewart ET: Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993, 329:1977-1981
12. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Järvinen HJ: Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995, 64:430-433
13. Wu BP, Zhang YL, Zhou DY, Gao CF, Lai ZS. Microsatellite instability, MMR gene, expression, and proliferation kinetics in colorectal cancer with familial predisposition. *World J Gastroenterol* 2000;6:902-905;

## ACTUALITĂȚI ÎN DIAGNOSTICUL ȘI ABORDAREA CHIRURGICALĂ A SINDROMULUI HIPERSPLENIC PORTAL CIROGEN

**Vladimir Cazacov**

Catedra Chirurgie Nr.2 USMF „Nicolae Testemițanu”

### **Summary**

#### *Actualities in diagnostics and treatment of portal cirrhogen hyperplenism*

In this article are presented news related to therapeutical and diagnostic approaches of the portal hypersplenism that nowadays, represents an actual problem of health. This fact is due to the distressful increasing of its prevalence. The article is focused on the elements of portal hypersplenism pathogeny, the impact of the surgical risk, diagnostic and therapeutic methods, specific to the hypersplenism.

### **Rezumat**

Articolul își propune să treacă în revistă actualități în abordarea diagnostică și terapeutică a sindromului hipersplenic cirogen, problemă de sănătate de mare actualitate prin creșterea alarmantă a prevalenței acestuia. Sunt discutate elemente de etiopatogenie, impactul hipersplenismului asupra riscului chirurgical, metode diagnostice și terapeutice specifice hipersplenismului portal secundar.